



(51) Int Cl<sup>5</sup>:  
C12P 7/62

(11) (21) **PI 9302312-0 A**

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL  
Ministério da Indústria, do Comércio e do Turismo  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(22) Data de Depósito: 30/06/93

(43) Data de Publicação: 07/02/95 (RPI 1262)

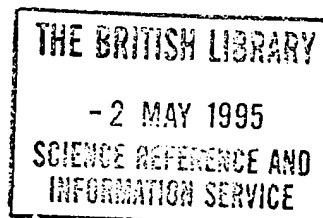
(54) Título: Processo de extração de biopolímeros

(71) Depositante(s): Cooperativa de Produtores de  
Cana, Açúcar e Alcool do  
Estado de São Paulo Ltda. -  
COPERSUC (BR/SP); Instituto  
de Pesquisas Tecnológicas do  
Estado de São Paulo S/A-IPT  
(BR/SP)

(72) Inventor(es): Silas Derenzo; Rosa Mitiko Saito  
Matsubara; Gracinda Martins  
Correia Garófalo; Alice Maria de  
Melo Ribeiro; Celso Lellis Bueno  
Netto; Paulo Eduardo Mantelatto;  
Carlos Eduardo Vaz Rossell

(74) Procurador: Fernando Garcia Gnocchi

(57) Resumo: Patente de Invenção de "PROCESSO DE  
EXTRAÇÃO DE BIOPOLÍMEROS", em que as células contendo o  
biopolímero são submetidas a um único solvente adequado, e em  
que a insolubilização do polímero no solvente se verifica sem a  
presença de agente insolubilizante.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção de "PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE BIOPOLÍMEROS".

INTRODUÇÃO

Várias linhagens de bactérias de solo  
05 acumulam material de reserva em condições não balanceadas de crescimento. Em algumas linhagens específicas estes materiais são polihidroxialcanoatos (PHA), que são poliésteres alifáticos, insolúveis em água, apresentando a repetição da seguinte estrutura:



Onde:

R, grupo n-alquil tem comprimento variável.

- 15 (R = metil, hidroxibutirato (HB))  
(R = etil, hidroxivalerato (HV))  
(R = propil, hidroxicapranoato (HC))  
(R = butil, hidroxiheptanoato (HH))  
(R = pentil, hidroxioctanoato (HO))

20 O polímero microbiano PHA pode atingir de 10 a 90% em relação ao peso seco das bactérias.

Trata-se de um polímero termoplástico que apresenta características equivalentes às encontradas em resinas plásticas convencionais, com a vantagem adicional  
25 de ser biodegradável.

As células contendo o biopolímero, em al

to grau, podem ser usadas In natura (sem tratamento com agentes que solubilizam os grânulos intracelulares) como material moldável, por exemplo, como descrito na US-3107172. No entanto, de um modo geral, recomenda-se separar o polímero do material celular para que o produto final atinja um grau de pureza e propriedades plásticas adequadas.

As diferentes aplicações dos biopolímeros dependem do grau de pureza do produto, do seu peso molecular, da presença e do teor de copolímeros que podem alterar as propriedades físicas e químicas dos produtos.

A obtenção e purificação de PHA é descrita no pedido de privilégio depositado no INPI sob número PI 9103116. O processamento para a obtenção de PHA e seus copolímeros envolve o rompimento celular e a extração do material polimérico. Este processamento consiste de um rompimento celular e de digestão enzimática e/ou extração por solventes seguido pela adição de outro agente que precipitará o polímero. O rompimento celular pode ser feito previamente aos tratamentos acima citados, ou ainda durante o próprio processamento.

A patente EPA-0145233A2 descreve várias possibilidades para proceder a digestão de uma suspensão aquosa de células contendo PHA, usando enzimas e ou agentes surfatantes para solubilizar o material celular não polimérico. A suspensão é aquecida previamente ou durante a digestão a cerca de 80°C para denaturar ácidos nucleicos. Esta patente coloca com possíveis restrições no uso de solventes a necessidade de grandes quantidades dos mesmos no processo de extração e os elevados custos de recuperação. Entretanto, menciona que a etapa de extração

por solvente não é eliminada, pois o produto direto da digestão tem utilização limitada. Além disso, as enzimas proteolíticas embora sejam adicionadas em quantidades mínimas (1% da massa seca de células), tem um custo elevado e não são recuperadas.

A extração de poli-Beta-hidroxibutirato e seus copolímeros com solventes orgânicos tem sido amplamente utilizada nos processos de recuperação a partir da massa seca ou úmida.

- 10 Algumas bactérias, como as do gênero alcalígenes produtoras de poli-hidroxialcanoatos, quando em contato com solventes orgânicos, liberam prontamente seu conteúdo de PHA. No entanto, bactérias como as do gênero Pseudomonas e outras constituídas de paredes espessas ,
- 15 requerem um tratamento adicional de rompimento celular , antes da etapa de adição de solvente de extração do polímero. Exemplos de técnicas de rompimento celular incluem:
- a) Tratamento com acetona (US-3036959 e 3044942);
  - b) Vibrações ultrassônicas, moagem, "French pressing", ciclos alterados de congelamento/descongelamento e tratamento com lisozima (US-3275610) ;
  - c) Floculações por alterações de pH e aquecimento da suspensão celular (EP-046017, US-4358583).
  - d) Spray ou flash drying (EP-15123, GB-2089823). A técnica que utiliza o spray drying é a mais adequada para as operações em larga escala (EP-A-124309).
- 25

Os processos extrativos que tem sido propostos consistem, basicamente, de um contato da massa celular com um líquido que solubiliza o polímero seguido da remoção do resíduo celular da solução repleta do polímero (PHA) dissolvido, seguido de sua precipitação pela a-

30

dição de um agente insolubilizante.

Os solventes orgânicos comumente empregados para a extração do polímero incluem diversos hidrocarbonetos parcialmente halogenados, tais como clorofórmio (US-3275610), cloreto de metileno/etanol(US-3044942), cloroetanos e cloropropanos com ponto de ebulição de 65 a 170°C (1,2 - dicloroetano; 1,1,2 - tricloroetano; 1,1,2,2 - tetracloroetano e 1,2,3 - tricloropropano) como descritos em EP-0014490 B<sub>1</sub> e 2446859.

10 A US-4705604 e EP-0168095 A<sub>1</sub>/B<sub>1</sub> descrevem um processo de extração de PHB apartir da suspensão celular aquosa, por meio de solventes (clorometanos, cloroetanos e cloropropanos) que dão uma mistura azeotrópica de baixo ponto de ebulição; a água é removida, azeotropicamente, do meio até obter-se um extrato anidro contendo PHB.

A extração de células secas com clorofórmio resulta um polímero com boas propriedades plásticas, mas o rendimento é baixo. A US-3036959 descreve um processo que utiliza piridina como líquido de extração para 20 melhorar o rendimento do processo.

Todas as patentes citadas apresentam como rota de separação do polímero HA a adição de um outro líquido miscível ao meio (agente precipitante) e que insolubilize o polímero, caracterizando processos conduzidos 25 em duas etapas sucessivas.

Como agentes precipitantes podem ser empregados o éter de petróleo, metanol, etanol, misturas de metanol/água e etanol/água. No entanto, novamente, a recuperação dos solventes empregados pode ser complexa pela 30 formação de misturas de difícil separação.

Um método alternativo para separar o polímero HA é através da precipitação deste por resfriamento do xarope. Este método não é viável quando são empregados os líquidos de extração propostos anteriormente, mas os carbonatos cíclicos geralmente levam à floculação do polímero com resfriamento do sistema. A US-4101533 descreve processo que utiliza carbonatos cíclicos (1,2 carbonato de propileno) como líquido de extração. No entanto, os carbonatos são relativamente caros e apresentam ponto de ebulição muito elevado que implica em alto consumo energético na etapa de recuperação. A EP-24810 e 58480 e GB-2120671 descrevem um processo de separação de PHB por resfriamento do líquido de extração (1,2 dicloroetano) até formação de géis. O solvente é expelido e recuperado por prensagem dos géis de PHB. Estas técnicas requerem grande consumo de energia pois envolvem etapas de congelamento e aquecimento e, além disso, a formação de géis pode ser lenta e incompleta.

#### DESCRIÇÃO DO PROCESSO

O processo descrito a seguir, objeto desta patente, pode ser operado de forma contínua ou intermitente, sendo que em qualquer caso as células contendo o biopolímero são processadas por um único solvente, caracterizando um processo de uma única etapa.

No presente processo, o material celular concentrado, previamente seco ou não, é submetido a uma extração com um solvente adequado, álcoois superiores e/ou seus ésteres. Em seguida, o resíduo celular é separado por técnicas mecânicas convencionais que podem ser de cantação, flotação, filtração, centrifugação ou, ainda, uma combinação desses métodos obtendo-se uma torta e uma

solução contendo o polímero. Esta passa por uma etapa de cristalização que se caracteriza pela insolubilização do polímero no solvente sem a presença de um agente insolubilizante. A cristalização pode ocorrer pelo aumento de  
05 concentração do polímero na solução pela remoção do solvente (por exemplo, por evaporação), associada ou não à saturação da solução pela diminuição da temperatura do meio. Em ambos os casos, o polímero irá se solidificar na solução sem a adição de um agente insolubilizante, podendo  
10 assim ser recuperado da solução por uma separação mecânica convencional (como já citadas acima). A solução separada pode então ser reciclada diretamente para a etapa de extração.

Caso o teor de impurezas se torne elevado  
15 na corrente de agente extrator, pode ser necessário uma purga desta corrente. A corrente de purga pode ser descartada ou ainda regenerada, por exemplo, por uma destilação retornando ao processo. Assim, este processo diferencia-se dos demais anteriormente descritos por não necessitar da presença de um composto químico adicional para  
20 insolubilizar o polímero e, conseqüentemente, de todos os equipamentos e operações auxiliares de separação de solvente e agente insolubilizante; etapa esta necessária ao reciclo de ambos. Como em todo o processo de separação industrial sempre ocorre perdas e consumo de energia.  
25 O processo ora descrito apresenta vantagens sobre os demais em termos de diminuição de perdas e redução do consumo energético, além de se basear no uso de um único composto.

30 Como dito anteriormente, o processo pode tratar células úmidas. Neste caso, a secagem e a extra-

ção do polímero pode ser feita numa única etapa se for escolhido um solvente adequado, e imiscível ou parcialmente miscível em água, como, por exemplo, o álcool isoamílico; a água pode ser removida por destilação da mistura no seu ponto de ebulição durante a extração. O material destilado pode então ser resfriado, formando duas fases, sendo que a aquosa é descartada e a de solvente retorna diretamente ao sistema de extração.

Para operar no modo acima proposto deve-se escolher condições apropriadas de pressão e temperatura de modo a evitar a decomposição térmica do polímero.

Para aumentar o tamanho dos grãos e facilitar a cristalização, esta pode ser semeada com grãos selecionados que atuam como germes de cristalização.

Nem todos os solventes encontrados na literatura prestam-se ao objetivo desta patente. Solventes cuja solubilidade do polímero é muito alta, em geral apresentam alta viscosidade, o que dificulta a etapa de cristalização.

A faixa de temperatura adequada ao processo de extração do polímero situa-se, em geral, sobre 40°C e o ponto de ebulição do solvente (no caso de células secas) ou no ponto de ebulição da mistura aquosa (no caso de células úmidas).

Uma vez efetuada a solubilização a quente, a precipitação do produto ocorre por resfriamento da solução até a temperatura ambiente, sendo que este resfriamento pode ser, eventualmente, precedido de uma purga de impurezas.

As operações de aquecimento, resfriamento e purga são realizadas em um único tanque, ou em dois



tanques em série, dotados de dispositivos de controle e atuação sobre a temperatura do sistema. Os tanques podem contar ainda com sistema de agitação para acelerar a extração e de um sistema de placas direcionadoras de fluxo para facilitar a decantação. Alternativamente, a suspensão de células em solvente pode ser aquecida em fluxo contínuo através de trocadores de calor e em seguida transferida para um tanque de resfriamento e decantação.

A quantidade de solvente a ser empregada depende do teor de biopolímero nas células e do tempo de extração sendo que a razão entre a massa de solvente e a massa de células varia entre 2,5 e 200, preferencialmente entre 10 e 150.

Os solventes mais adequados, objeto desta patente, são os álcoois de cadeia superior a 3 carbonos e os acetatos deles derivados.

Dá-se preferência como agentes solubilizantes nesta patente, porém, não exclusivamente, ao álcool isoamílico (3-metil-1-butanol), ao acetato de amila (acetato de isoamila ou éster amil acético) e ao óleo fúsel (subproduto de fermentação na produção fermentativa de etanol, de composição variável mas que contenha basicamente álcool isoamílico e álcool n-pentílico). Estes compostos apresentam um ponto de ebulição adequado ao processamento à pressão atmosférica, por terem uma faixa de ponto de ebulição abaixo da temperatura de degradação do material polimérico (álcool isoamílico, ponto de ebulição 132°C; acetato de isoamila, ponto de ebulição entre 120°C e 145°C e óleo fúsel, ponto de ebulição entre 122°C e 138°C). Além disso, sendo imiscíveis, ou parcialmente miscíveis em água, adaptam-se perfeitamente à ex-

tração do polímero de células úmidas.

O processo compreende ainda uma fase final em que o material cristalizado é separado do solvente por decantação, flotação, filtração, centrifugação ou  
05 outro, e submetido a uma etapa de purificação para retirada do solvente residual, compreendendo a lavagem de dito material com vapor e/ou com água na temperatura próxima ou igual a ebulição da água, submetendo-se em seguida a secagem.

## 10 EXEMPLOS

Exemplo I :

10g de células com umidade de 50% até 80% em peso contendo o biopolímero que representa de 50% até 80% do peso seco das células foram tratados com até 2.500ml de  
15 álcool isoamílico, sob refluxo, por um período não superior a 5 horas, removendo-se a água no início do processo, por separação de parte do refluxo. O precipitado obtido, após resfriamento e secagem, gera até 4,0 g de biopolímero.

20 Exemplo II :

10g de massa celular bacteriana seca, contendo biopolímero que representa de 50% a 80% do peso seco das células foram adicionadas em até 1.500ml de acetato de isoamila e refluxados por um período não superior a 4 horas,  
25 fornecendo ao final do processo, 4,0g do poliéster seco, sendo que nos melhores casos recupera-se até 7,6g de produto por resfriamento e secagem.

Exemplo III :

10g de células secas contendo o biopolímero que representa de 50% a 80% do peso seco das células, adicionadas  
30 em até 2.000 ml de óleo fúsel, sofreram refluxo durante

um período não superior a 4,5 horas, gerando, após resfriamento e secagem, 3,5g de PHB, sendo que nos melhores casos pode-se recuperar até 7,6g de produto.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo de extração de biopolímeros, caracterizado em que o material celular concentra  
do, previamente seco ou não, é misturado a um solvente  
05 adequado, especificamente álcoois superiores, de preferência de cadeia superior a três carbonos, ou qualquer um de seus acetatos, preferentemente o álcool isoamílico, o acetato de amila, o acetato de isoamila ou o óleo fusel, este último subproduto de fermentação alcoólica  
10 contendo basicamente álcool isoamílico e álcool n-pentílico.

2. Processo de extração de biopolímeros, reivindicado em 1, caracterizado em que a razão entre a massa de solvente e a massa de células na solução varia entre 2,5 e 200, preferencialmente entre 10  
15 e 150.

3. Processo de extração de biopolímeros, reivindicado em 1 e 2, caracterizado pelo fato da mistura células e solvente ser submetida a um aquecimento numa faixa de temperatura entre 40°C e o ponto  
20 de ebulição do solvente (no caso de células secas) ou no ponto de ebulição da mistura formada pelo solvente e água proveniente do concentrado celular até o ponto de ebulição do solvente (no caso de células umidas).

25 4. Processo de extração de biopolímeros, reivindicado em 1, 2 e 3, caracterizado em que a

solução contendo o biopolímero e o solvente é separada do resíduo celular por decantação, flotação, filtração centrifugação ou outro, e submetida a uma etapa de cristalização dos biopolímeros através da remoção do solvente (por evaporação ou outro) associada ou não esta última à saturação da solução por resfriamento da mesma até a temperatura ambiente.

5. Processo de extração de biopolímeros, reivindicado em 1, 2, 3 e 4, caracterizado em que o material cristalizado é separado do solvente por decantação, flotação, filtração, centrifugação ou outro, e submetido a uma etapa de purificação para retirada do solvente residual, compreendendo a lavagem de dito material com vapor e/ou com água na temperatura próxima ou igual a abulição da água, submetendo-o em seguida a secagem.

9302312

1

RESUMO

Patente de Invenção de "PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE BIOPOLÍMEROS", em que as células contendo o biopolímero são submetidas a um único solvente adequado, e em que a insolubilização do polímero no solvente se verifica sem a presença de agente insolubilizante.